动 物 学 研 究 2009，Dec. 30(6):653-661 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2009.06653

海马 NMDA 受体和 NOS 在慢性应激性抑郁发生中的作用及其相互关系

李庆娇，安书成*

(陕西师范大学 生命科学学院，陕西 西安 710062）

摘要：运用慢性不可预见性温和应激（chronic unpredicted mild stress, CUMS）建立抑郁动物模型，通过海马内微量注射、动物行为学观察及免疫组织化学方法检测海马内一氧化氮合酶（nitric oxide synthase，NOS）表达的变化，探讨 CUMS 诱发抑郁与海马谷氨酸 *N*-甲基-D-天冬氨酸（*N*-methyl-D-aspartic acid，NMDA）受体和 NOS 的关系。结果发现：CUMS 组大鼠表现出抑郁样行为变化，海马 NOS 表达显著升高；海马微量注射 NMDA 受体激动剂，动物行为学表现与 CUMS 组相同，NOS 表达升高；海马微量注射非竞争性 NMDA 受体拮抗剂 MK-801 能明显改善应激引起的抑郁样行为表现，并降低海马 NOS 表达。这些结果表明慢性不可预见性应激可能使谷氨酸（glutamic acid，Glu）过量释放，NMDA 受体过度激活，NOS 高表达，NO 过量产生，损伤海马神经元，导致抑郁发生。

关键词：抑郁；海马；NMDA 受体；一氧化氮合酶
中图分类号：Q189；R749.4 **文献标识码**：A **文章编号**：0254-5853-(2009)06-0653-09

Involvement of Hippocampal NMDA Receptor and Nitric Oxide Synthase in Depression Induced by Chronic Unpredicted Mild Stress

LI Qing-jiao, AN Shu-cheng*

(*College of Life Science, Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi* 710062, *China*)

Abstract: In order to investigate whether N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptor and nitric oxide synthase (NOS) made contributions to the depression induced by chronic unpredicted mild stress (CUMS)，the depression model was established by using the CUMS. Using the stereotaxic and intra-hippocampal microinjection observing rat emotion and behaviors by the change in body weight, sucrose preference test, open field test and forced swimming test, and immunohistochemistry, and the expression of NOS in hippocampus were tested. The results showed that depression-like behavior and the expression of NOS increased in hippocampus induced by rats receiving CUMS for 21 days or intra-hippocampal injections of NMDA receptor agonist. Intra-hippocampal injection of noncompetitive NMDA receptor antagonist MK-801 significantly prevented CUMS-induced depression-like behavioral changes, and decreased the expression of NOS. These results provide evidence that CUMS resulting in development of depression may induce neurotoxicity in hippocampal neurons by stimulating Glu release, inducing excessive activation of NMDA receptor, and increasing expression of NOS.

Key words: Depression; Hippocampus; NMDA receptor; NOS

抑郁症（depression）是由各种原因所引起的以情感性障碍，心境低落，思维迟钝，语言行动减少以及认知上的不合乎逻辑性和不切实际性为主要特征的综合性精神疾病。随着日常压力增大，抑郁症发病率也呈逐年上升的趋势，且具有高发病率、高复发率、发病年龄逐年降低等特点。据估计抑郁症已经波及全球 21%的人口，世界卫生组织预计，到 2020 年抑郁症将会成为导致死亡的第二大疾病 (Schechter et al, 2005)。因此，研究抑郁发生的原因、机制及其治疗对策既是临床医学研究的重要问题，

收稿日期：2009-07-15；接受日期：2009-10-29
基金项目：陕西省自然科学基金资助项目（2006C240）
*通讯作者（Corresponding author），E-mail: shuchengan@snnu.edu.cn
第一作者简介：李庆娇，女，硕士研究生，主要从事神经生理学方面的研究

也是神经科学、生理心理学研究高度关注的问题。

应激引起机体产生一系列反应，其中最主要的是下丘脑–垂体–肾上腺（hypothalamic－pituitary－adrenal，HPA）轴激活。正常的HPA轴功能是生存所必需的，然而，重复的HPA轴激活能产生损伤性生理效应，对脑结构造成严重的损害（Bowman et al, 2003）。海马是与情感、情绪密切相关的重要脑区，海马富含各种神经递质及受体，对应激最为敏感，是应激反应的高位调节中枢，慢性应激可引起海马结构和功能的变化(Kim & Diamond, 2002)。海马又是应激激素作用的靶点，应激和高糖皮质激素影响海马树突的形态结构的重塑(Zhang, 2001; Duman, 1999; Rajkoska, 2000)。因此，海马是目前抑郁症研究中涉及最多的脑区。

以往研究抑郁症发病机理被广泛接受的是单胺类神经递质失调，随着研究的不断深入，发现兴奋性氨基酸，尤其是谷氨酸（glutamic acid，Glu）及其*N*-甲基-D-天冬氨酸（*N*-methyl-D-aspartic acid，NMDA）受体在抑郁症的发生中具有重要作用。研究发现，应激时大鼠海马谷氨酸水平显著增高(Yan et al，1995)，谷氨酸使NMDA受体过度激活，从而造成兴奋性神经毒性作用与多种神经疾病有关，NMDA受体阻断剂及其相关药物具有抗抑郁作用(Maeng et al, 2008)。基于Glu及其受体变化研究抑郁发生已成为目前研究的热点。

一氧化氮（nitric oxide，NO）作为一种神经递质在中枢神经系统中起着两方面的作用，低浓度的NO起信使作用，而过量的NO则导致神经元的损伤。最近的研究表明，NO参与精神性疾病，如抑郁、双向情感障碍、精神分裂等(Li et al，2002；Franke et al, 2003)。也有研究发现慢性应激性抑郁症脑损伤过程可能有NO参与，慢性综合应激可导致海马一氧化氮合酶（nitric oxide synthase，NOS）表达增加，产生过量的NO，使海马神经元受损（Wang & Kuang, 2005）。海马中有多种NOS分布，其中神经元型一氧化氮合酶（neuronal nitric oxide synthase，nNOS）和诱导型一氧化氮合酶（inducible nitric oxide synthase，iNOS）产生过量的NO具有神经毒素作用(Kone et al, 2003)。氟西汀抗抑郁使损伤神经元恢复与其抑制海马NOS量有关(Nacher & Pham, 2004)。Wang et al（2008a）的研究结果显示，海马注射iNOS抑制剂具有抗应激性抑郁的作用，脑源性神经营养因子（brain-derived neurotrophic factor，BDNF）抗抑郁与抑制海马nNOS表达有关（Wang et al，2008b）。还有研究发现，一些抗抑郁药物可影响NOS的表达和活性（Finkel et al, 1996; Wegener et al, 2003），证实了抗抑郁药氟西汀能够通过抑制NOS而降低抑郁大鼠的海马萎缩（Luo & Tan, 2001）。关于慢性应激通过NMDA受体导致的神经损伤机制，人们广泛关注的是由于NMDA受体激活使得Ca^{2+}超载，从而引起的NOS过表达，进一步导致神经毒性作用（Paul，2001；Xie et al，2004）。有动物实验证明，NOS抑制剂L-硝基精氨酸甲酯可减轻海马内注射NMDA引起的神经损害（Zhang，2001）。

然而，NMDA受体过度激活是否会导致抑郁，慢性应激与Glu、NMDA受体、NOS、抑郁发生之间是什么关系，目前仍不清楚。因此，本研究通过建立慢性不可预见性应激抑郁动物模型，试图根据应激通过Glu-NMDA受体的变化，影响海马NOS的改变，引起海马神经元损伤这一思路探讨抑郁症发生的可能机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

健康雄性SD大鼠32只（250～300 g），陕西省中医研究院实验动物中心提供（医动字08–25）。实验前饲养一周以适应环境，自由进食饮水。动物分为4组，每组8只: A组为对照组，正常饲养，海马微量注射生理盐水；B组为慢性不可预见性温和应激（CUMS）模型组，海马微量注射生理盐水；C组为CUMS+海马微量注射MK-801组（0.5 μg/μL）；D组为海马微量注射NMDA组（0.5 μg/μL）。

1.2 主要试剂

MK-801 购于美国 Alexis 公司，*N*-methyl-D-aspartic acid（NMDA）购于美国Sigma公司，iNOS抗体、nNOS抗体为santa cruz公司产品由北京中杉金桥生物技术有限公司分装；SABC试剂盒和DAB试剂盒均为武汉博士德生物技术工程有限公司产品。

1.3 方 法

1.3.1 脑立体定位及海马微量注射 大鼠以戊巴比妥钠腹腔注射麻醉（40 mg/kg），俯卧位固定于WDT-Ⅱ型立体定位仪（美国，Stoelting），参照Paxinos & Watson大鼠脑图谱，向海马（AP-3.8

mm, RL 2.5 mm, H 2.2 mm） 处植入一外径 0.9 mm 带有内心的不锈钢套管，用玻璃离子体水门汀固定，外层用牙托粉加固。术后每天腹腔注射青霉素 20 万单位持续 3 d，自由取食饮水，一周后海马微量注射药物，每 7 天给药一次，共 4 次，21 d。

采用 1 μL 微量进样器通过埋植套管匀速注射药品，每次注射体积均为 1 μL，1 min 内注射完毕，停针 1 min 防止药物外溢。注射时管芯伸出套管 1 mm 下插到海马。

实验结束后，取脑行冠状切片观察套管轨迹，定位不准确者弃去。

1.3.2 慢性不可预见性温和应激模型 大鼠单笼饲养，将倾斜鼠笼 24 h、明暗颠倒 24 h、4℃冰水游泳 5 min、45℃热水游泳 5 min、停水 24 h、停食 24 h、夹尾 1 min、水平摇晃 5 min、湿垫料 24 h，共 9 种刺激随机安排到 21 d 内，每日一种，每种刺激至少出现 2 次，同种刺激不能连续出现，使动物不能预料刺激的发生(Willner, 1997; Xu & Li, 2003)。对照组和海马微量注射 NMDA 组不予任何刺激，正常进食饮水。各组分别在第 1、7、14、21 天称量动物体重，应激建模 21 d 后，进行行为学实验。

1.4 行为学观察

1.4.1 糖水测试 实验前在隔噪音，安静的房间内训练动物适应含糖饮水。每笼同时放置 2 个水瓶，第一个 24 h，两瓶均装有 1%蔗糖水；随后的 24 h，一瓶装有 1%蔗糖水，一瓶装纯净水；在 24 h 的禁食禁水后，进行动物的糖水消耗实验。同时给予每只大鼠预先定量好的一瓶 1%蔗糖水，一瓶纯水，24 h 后测量糖水消耗量，并计算动物的糖水偏爱(糖水偏爱=糖水消耗/总液体消耗×100%)(Willner, 1987)。

1.4.2 旷场实验 实验装置为 100 cm×100 cm×40 cm，四周底面全部涂黑的无盖木制方箱，底面用白线划分成 20 cm×20 cm 的方格。在箱子上方 1 m 处放置一摄像头，镜头对准箱底，实验在安静环境下进行，将动物小心放在箱底中心，观察 5 min 内活动情况。观察指标(1)水平穿行方格数：三爪以上跨入邻格或者重心落入；（2）竖直站立次数：前肢离开水平地面 1 cm 以上的次数；（3）修饰次数: 理毛或者洗脸的次数。每次做完实验后清理箱内残留物，清除掉上一只鼠的气味，以免影响下一只鼠的行为。水平运动表明，活动程度，垂直运动表明对新异环境探究程度，自我修饰的次数，表明对自身的关注度。

1.4.3 强迫游泳实验 将鼠单独放入一直径 18 cm、高 40 cm 的透明玻璃筒中，水筒置于安静的房间，筒内水面距水筒上缘 10 cm，水温 23～25 ℃。在玻璃筒的水平位置放置摄像头，游泳进行 6 min，前 2 min 不作记录，而观察记录后 4 min 内的漂浮不动时间，用鼠的不动时间作为判断抑郁严重程度的指标。每次实验后冲洗水缸、换水，避免对下一只测试鼠产生影响。

1.5 免疫组织化学实验

大鼠腹腔注射戊巴比妥钠麻醉，由左心室注入微热的 0.1 mol/L PBS 300 mL，然后灌注 4%多聚甲醛 400 mL 进行前固定，小心取脑入 4%多聚甲醛后固定 7～9 h（4 ℃），再浸入 30%蔗糖溶液待其沉底。OCT 冰冻包埋剂包埋后冰冻切片，切片厚 40 μm。切片后首先在山羊血清 37 ℃下孵育 2 h 进行封闭，然后入一抗 4 ℃孵育 72 h，0.01 mol/L PBS 漂洗后分别于二抗和 SABC 中 37 ℃下孵育 2 h，0.01 mol/L PBS 冲洗 3 次，每次 5 min， DAB 显色 10～15 min 后在 0.01 mol/L PBS 中漂洗后贴片风干，梯度酒精脱水， 二甲苯透明，封片。阴性对照用 0.01 mol/L PBS 代替一抗 iNOS 和 nNOS，其他步骤同上。

1.6 数据处理

参照Paxinos & Watson《大鼠脑立体定位图谱》，从每只鼠的切片中随机各取 10 张。每张切片同一脑区在光镜下随机选取 10 个视野，用目镜测微网格在面积为 5mm×5mm 的精网格中数出阳性细胞数目。用SPSS14.0 软件进行数据处理，数据以平均值±标准误（$M\pm SE$）表示，总体比较检验采用单因素方差分析（one-way ANOVA），组间多重比较采用事件后分析（post-hoc，LSD）检验，以$P<0.05$作为判断差异显著性的标准，$P<0.01$ 表示有极显著性差异。

2 结 果

2.1 大鼠体重变化率

对照组大鼠体重变化率呈明显上升趋势，与对照组相比，CUMS 组体重增长很不明显，且与对照组在第 7、14、21 天均有极显著性差异（$P<0.01$）。MK-801+CUMS 组体重变化率在第 7 天有明显上升且与 CUMS 组有显著性差异（$P<0.05$），在第 14、

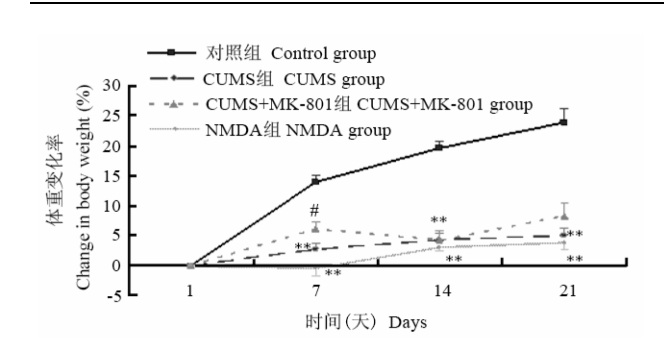


图 1 四组大鼠在实验 21 d 中的体重变化

Fig. 1 Effects produced by different treatment on body weight change

海马微量注射生理盐水、慢性不可预见性温和应激同时海马微量注射生理盐水、慢性不可预见性温和应激同时海马微量注射MK-801 以及单独海马微量注射NMDA四组大鼠在实验阶段第 7、14 和 21 天与第 1 天相比，体重的变化情况。**：与对照组相比，有极显著差异（P<0.01）；#：与应激组相比，有显著性差异（P<0.05）(单因素方差分析）。

Intral-hippocampal injection of saline alone (control), saline plus chronic unpredicted mild stress (CUMS), MK-801 plus CUMS (CUMS+MK-801), and N-methyl-D-aspartic acid alone (NMDA) on the average body weight change before intral-hippocampal injection on days 7, 14 and 21.

Mean with "**" is dramatically different from control （P<0.01）, mean with "#" is significantly different from CUMS （P<0.05）(one-way ANOVA）.

21 天 MK-801+CUMS 组体重变化率又有回落，与 CUMS 组相比无显著性差异。 NMDA 组在第 7 天体重变化率呈下降趋势，第 14、21 天有所上升，但上升的速率非常缓慢，与对照组相比均有极显著性差异（P<0.01）（图 1）。

2.2 行为学测试结果

2.2.1 糖水测试结果 四组大鼠糖水消耗量与糖水偏爱率总体比较，差异有统计学意义[$F_{(3, 23)}$=6.66，P<0.01；$F_{(3, 23)}$=8.13，P<0.01]。CUMS 组大鼠糖水消耗量明显低于对照组(P<0.01)，对糖水的偏爱也显著低于对照组（P<0.05)。海马微量注射NMDA后糖水的消耗量也有明显下降（P<0.05)。海马注射MK-801 能明显提高CUMS组大鼠对糖水的偏爱，与CUMS组比较，具有极显著差异（P<0.01)。(表 1)。

2.2.2 旷场实验测试结果 四组大鼠在旷场实验中的水平得分、垂直得分和修饰得分总体比较有显著差异[$F_{(3, 23)}$=3.81，P<0.05；$F_{(3, 23)}$=4.11， P<0.05；$F_{(3, 23)}$=4.54，P<0.05]。21 d慢性应激后，CUMS组的水平运动得分和垂直运动得分都明显低于对照组，在 0.01 水平下差异显著，修饰得分也显著低于对照组（P<0.05)。MK-801+CUMS 组与 CUMS 组相比，水平运动得分和垂直运动得分在 0.05 水平下都有显著增加，修饰得分极显著增加(P<0.01)，与对照组相比，均无显著性差异。NMDA 组各得分与对照组比较，在 0.05 水平下均有显著性降低 (图 2)。

表 1 四组大鼠在糖水测试中的表现(M±SE)

Tab. 1 Effects produced by different treatment on sucrose preference test (M±SE)

分组 Groups	个数 Size	糖水偏爱率 Sucrose preference（%）	糖水消耗量 Sucrose consumption（mL）
对照组 Control	7	78.56±3.73	78.83±7.77
应激组 CUMS	8	63.96±5.10*	33.64±3.92**
应激+阻断剂组 CUMS+MK-801	6	84.99±4.82##	51.83±12.16
激动剂组 NMDA	7	89.75±1.41	52.57±4.20**

海马微量注射生理盐水、慢性不可预见性温和应激同时海马微量注射生理盐水、慢性不可预见性温和应激同时海马微量注射MK-801 以及单独海马微量注射NMDA四组大鼠在应激后 1 d的糖水消耗与糖水偏爱率：*与对照组相比，有显著差异（P<0.05)；**与对照组相比，有极显著差异（P<0.01)；##与应激组相比，有极显著性差异（P<0.01) (单因素方差分析)。

Intral-hippocampal injection of saline alone (control), saline plus chronic unpredicted mild stress (CUMS), MK-801 plus CUMS (CUMS+MK-801), and N-methyl-D-aspartic acid alone (NMDA) on sucrose consumption and sucrose preference 1 day after CUMS.

Mean with "*" is significantly different vs control （P<0.05）, mean with "**" is dramatically different from control （P<0.01）, mean with "##" is dramatically different from CUMS （P<0.01）(one-way ANOVA）.

2.2.3 强迫游泳测试结果 各组大鼠在强迫游泳实验中的不动时间总体比较差异显著[$F_{(3, 23)}$=3.38，P<0.05]。进行了 21 d的CUMS后大鼠的不动时间显著高于对照组（P<0.05)。CUMS同时给予MK-801 后大鼠的游泳不动时间与CUMS组相比又显著降低（P<0.05)，且与正常水平接近。NMDA 组大鼠的游泳不动时间与对照组相比，显著升高(P<0.05) (图 3)。

2.3 免疫组织化学检测结果

2.3.1 nNOS在海马的表达 免疫组织化学检验发现，不同处理的大鼠海马齿状回（dentate gyrus，DG）与CA3 区nNOS表达总体比较差异显著[$F_{(3, 23)}$=12.29，P<0.01；$F_{(3, 23)}$=10.45，P<0.01]。慢

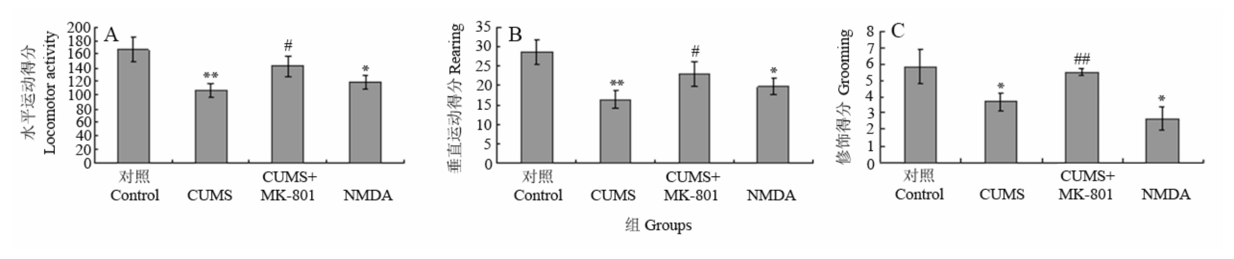


图 2　四组大鼠在敞箱实验中的行为表现

Fig. 2　Effects produced by different treatment on open－field test

海马微量注射生理盐水、慢性不可预见性温和应激同时海马微量注射生理盐水、慢性不可预见性温和应激同时海马微量注射 MK-801 以及和单独海马微量注射 NMDA 四组大鼠在旷场实验中的(A)水平运动得分，(B)垂直运动得分和(C)修饰得分。

*：与对照组相比，有显著差异（$P<0.05$）；**：与对照组相比，有极显著差异（$P<0.01$）；#：与应激组相比，有显著差异（$P<0.05$）；##：与应激组相比，有极显著差异（$P<0.01$）(单因素方差分析) 。

Intral-hippocampal injection of saline alone (control), saline plus chronic unpredicted mild stress (CUMS), MK-801 plus CUMS (CUMS+MK-801), and N-methyl-D-aspartic acid alone (NMDA) on (A) locomotor activity, (B) rearing and (C) grooming in open field test. Mean with "*" is significantly different from control ($P<0.05$), mean with "**" is dramatically different from control ($P<0.01$), mean with "#" is significantly different from CUMS, mean with "##" is dramatically different from CUMS（$P<0.01$）（one-way ANOVA）.

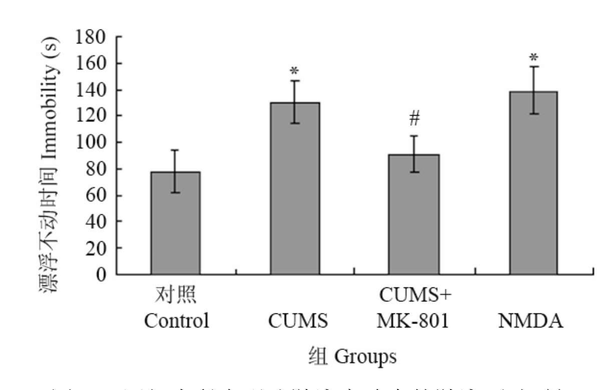


图 3　四组大鼠在强迫游泳实验中的游泳不动时间

Fig. 3　Effects produced by different treatment on forced swimming test

海马微量注射生理盐水、慢性不可预见性温和应激同时海马微量注射生理盐水、慢性不可预见性温和应激同时海马微量注射 MK-801 和单独海马微量注射 NMDA 四组大鼠在强迫游泳实验中的不动时间。

*表示与对照组相比，有显著差异（$P<0.05$）；#：与应激组相比，有显著差异（$P<0.05$）(单因素方差分析) 。

Intral-hippocampal injection of saline alone (control), saline plus chronic unpredicted mild stress (CUMS), MK-801 plus CUMS (CUMS+MK-801), and N-methyl-D-aspartic acid alone (NMDA) on the duration of immobility in forced swimming test.

Mean with "*" is significantly different from control ($P<0.05$), mean with "#" is significantly different from CUMS（one-way ANOVA）.

性应激大鼠海马 DG 与 CA3 区 nNOS 的表达均有极显著升高（$P<0.01$）。MK-801+CUMS 组与 CUMS 组相比，海马齿状回与 CA3 区 nNOS 的表达均有极显著下降（$P<0.01$），与对照组相比，齿状回 nNOS 表达无显著差异，而 CA3 区 nNOS 表达明显高于对照组（$P<0.01$）。 NMDA 组海马齿状回 nNOS 表达与对照组相比， 显著升高（$P<0.05$），而 CA3 区 nNOS 表达升高，但无显著差异（$P>0.05$）(图 4，图 6)。

2.3.2　iNOS在海马的表达　One-way ANOVA分析表明，四组大鼠海马DG和CA3 区iNOS表达总体比较，差异有统计学意义[$F_{(3,23)}=30.99$，$P<0.01$；$F_{(3,23)}=13.91$，$P<0.01$]。21 d的慢性不可预见性应激后大鼠海马齿状回与CA3 区iNOS的表达与对照组相比均有极显著升高（$P<0.01$）。慢性应激同时海马微量注射MK-801，与CUMS组相比，大鼠海马齿状回iNOS 表达有所降低，但无统计学意义，而CA3 区iNOS的表达显著下降（$P<0.05$）；齿状回和CA3 区iNOS 表达均明显高于对照组（$P<0.01$，$P<0.05$）。海马微量注射 NMDA 后，海马齿状回和 CA3 区 iNOS 的表达与对照组相比，均有极显著升高（$P<0.01$）(图 5，图 6)。

3　讨　论

抑郁症患者的临床症状主要表现为活动力下降、兴趣丧失及食欲降低等。慢性不可预见性温和应激模型与人类抑郁症临床特征相似，被广泛应用为抑郁动物模型(Willner, 1997; Naranjoa et al, 2001)。经 21 d 慢性应激后，应激组动物出现体重增长明显缓慢、探索行为及对新鲜环境的好奇程度降低、自身关注下降等症状，都与人类抑郁症表现相似。同时实验结果显示，应激后动物糖水消耗量及糖水偏爱程度明显减少，糖水偏爱降低是衡量快感缺乏的有效客观指标（Willner, 1987; Lin et al, 2005)。

海马属于边缘系统的重要组成部分，长期、慢

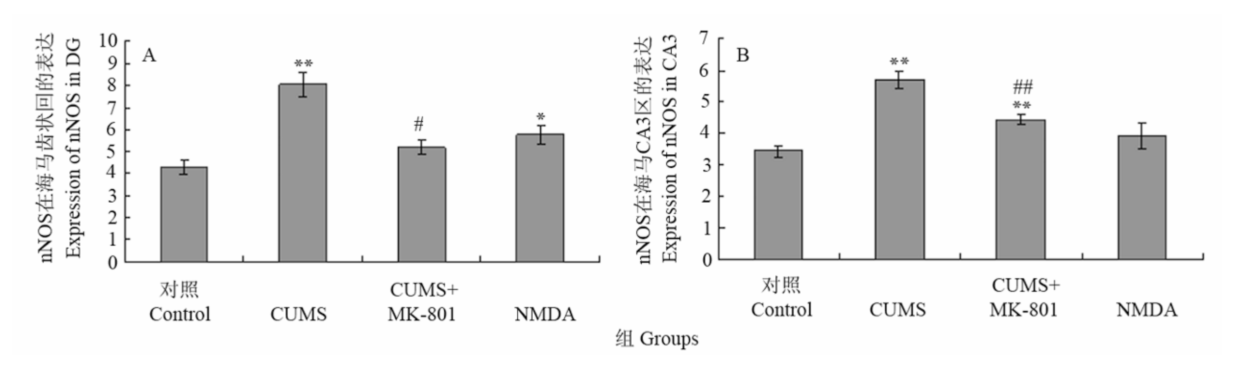


图 4 四组大鼠海马中 nNOS 阳性神经元数目

Fig. 4 Number of nNOS-ir neurons in the hippocampus for each group

海马微量注射生理盐水、慢性不可预见性温和应激同时海马微量注射生理盐水、慢性不可预见性温和应激同时海马微量注射 MK-801 和单独海马微量注射 NMDA 四组大鼠在海马齿状回(A)和 CA3 区(B)神经元型一氧化氮合酶的阳性颗粒数目。

*：与对照组相比，有显著差异（$P<0.05$）；**：与对照组相比，有极显著差异（$P<0.01$）；##：与应激组相比，有极显著差异（$P<0.01$）(单因素方差分析) 。

Intral-hippocampal injection of saline alone (control), saline plus chronic unpredicted mild stress (CUMS), MK-801 plus CUMS (CUMS+MK-801), and N-methyl-D-aspartic acid alone (NMDA) on the number of nNOS-immunostaining in (A) DG and (B) CA3 of hippocampus of rats.

Mean with "*" is significantly different from control ($P<0.05$), mean with "**" is dramatically different from control ($P<0.01$), mean with "##" is dramatically different from CUMS ($P<0.01$) (one-way ANOVA).

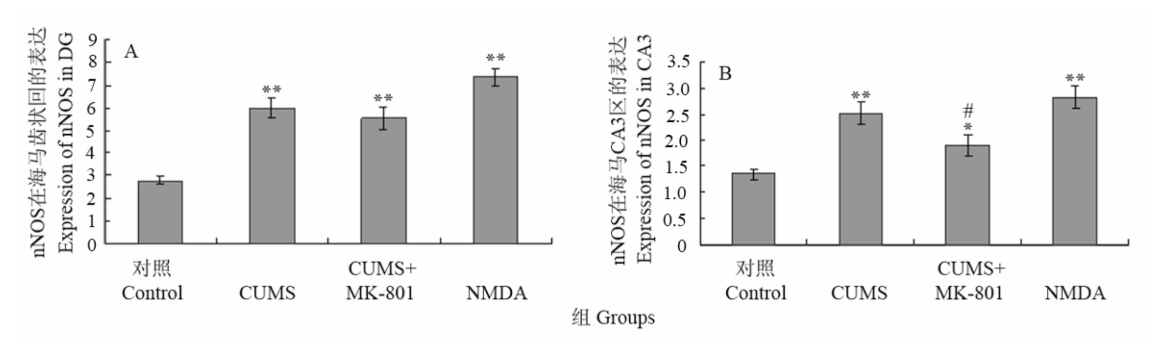


图 5 四组大鼠海马中 iNOS 阳性神经元数目

Fig. 5 Number of iNOS-ir neurons in the hippocampus for each group

海马微量注射生理盐水、慢性不可预见性温和应激同时海马微量注射生理盐水、慢性不可预见性温和应激同时海马微量注射 MK-801 和单独海马微量注射 NMDA 四组大鼠在海马齿状回(A)和 CA3 区(B)诱导型一氧化氮合酶的阳性颗粒数目。

*：与对照组相比，有显著差异（$P<0.05$）;，**：与对照组相比，有极显著差异（$P<0.01$）；#：与应激组相比，有显著差异（$P<0.05$）(单因素方差分析) 。

Intral-hippocampal injection of saline alone (control), saline plus chronic unpredicted mild stress (CUMS), MK-801 plus CUMS (CUMS+MK-801), and N-methyl-D-aspartic acid alone (NMDA) on the number of iNOS-immunostaining in (A) DG and (B) CA3 of hippocampus of rats.

Mean with "*" is significantly different from control ($P<0.05$), mean with "**" is dramatically different from control ($P<0.01$), mean with "#" is significantly different from CUMS ($P<0.05$) (one-way ANOVA).

性的应激使神经内分泌系统紊乱，脑内尤其是海马多种神经递质表达异常而对海马造成损伤，慢性应激可导致海马 CA3 区锥体细胞出现顶树突的数目和总长度减少或锥体细胞死亡，并抑制海马齿状回颗粒细胞层的细胞再生(Duman et al, 1999)。研究发现，应激引起大鼠海马 Glu 水平升高(Yan J et al, 1995)。目前，谷氨酸及其 NMDA 受体因与多种神经疾病，如抑郁症等相关而被广泛关注，调节 NMDA 受体通道活性可能具有治疗或辅助治疗抑郁的效应。 NMDA 受体非竞争性拮抗剂在动物模型中已被广泛地证明具有抗抑郁样作用(Maeng et al, 2008; Papp & Moryl, 1994)。 应激导致 Glu 过量释放，NMDA 受体高度激活，MK-801 与 NMDA 受体结合，抑制其作用，从而达到抗抑郁的目的。

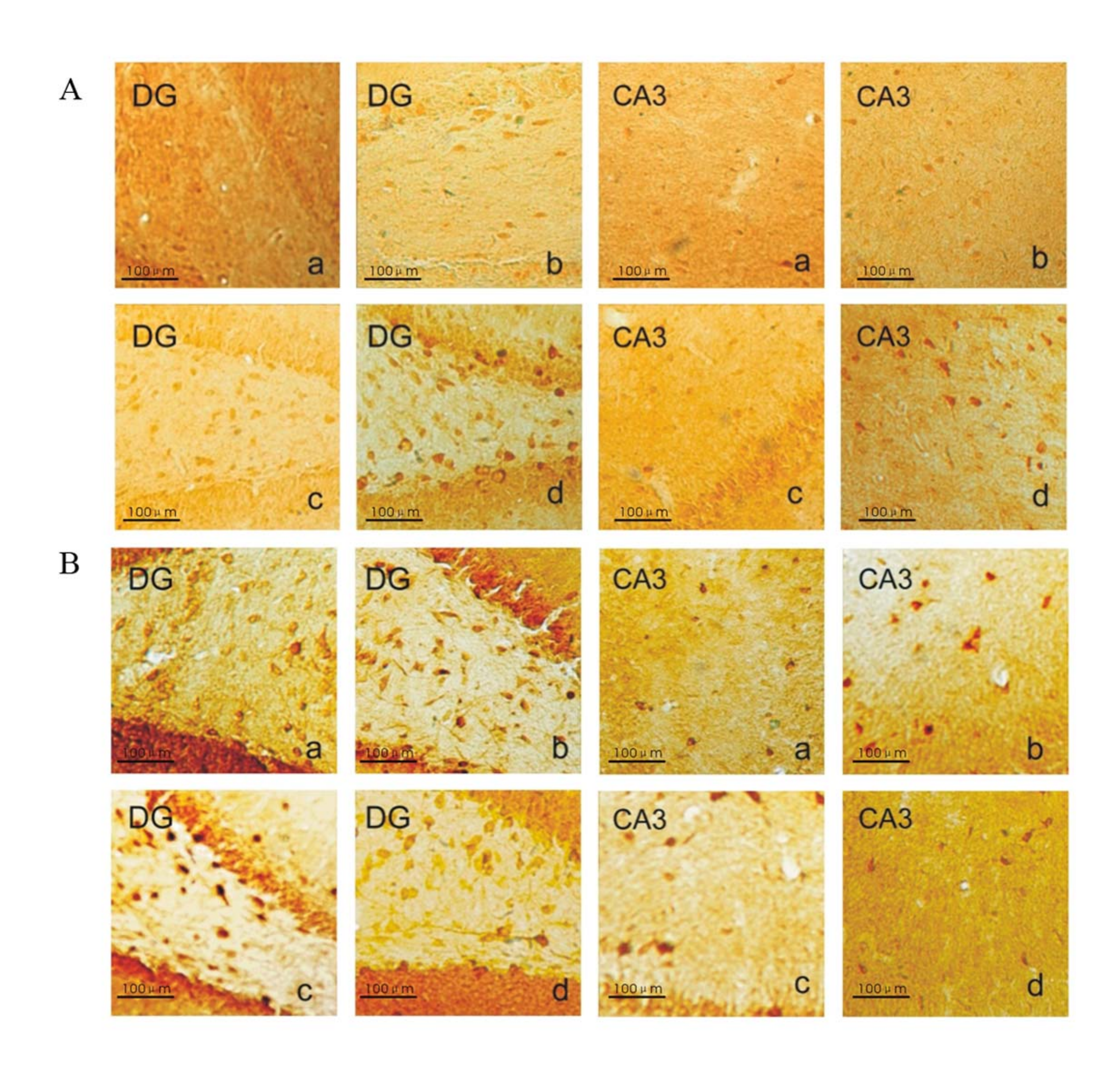


图 6　神经元型一氧化氮合酶（A）与诱导型一氧化氮合酶（B）在大鼠海马中的表达

Fig. 6　Expression of nNOS (A) and iNOS (B) in hippocampus of rats

a: 对照组；b: 慢性不可预见性温和应激组；c：慢性不可预见性温和应激+MK-801 组；d: 海马微量注射 NMDA 组。DG：海马齿状回区；CA3：海马 CA3 区。

a: control; b: CUMS; c: CUMS+MK-801; d: NMDA. DG：dentate gyrus of hippocampus; CA3: CA3 of hippocampus.

实验结果也显示，慢性不可预见性应激和海马注射 NMDA 均能引起抑郁样行为表现，并在慢性应激的同时微量给予 MK-801，可以明显抗应激诱发的抑郁，这一结果充分说明慢性不可预见性应激引起抑郁发生与 Glu 激活 NMDA 受体密切相关。与以往关于抑郁症患者脑内 Glu 水平升高及应激引起大鼠海马 Glu 水平升高的研究结果相一致。

NO作为一种非典型的神经信使，近年来备受关注。NO由NOS催化L-精氨酸而成，其中nNOS在生理状态下即有表达，活性依赖于细胞内Ca^{2+}及钙调蛋白；iNOS的活性不依赖于Ca^{2+}及钙调蛋白，生理状态不表达，需诱导产生(Qin, 2002)。Suzuki et al（2001）通过临床研究检测到抑郁患者血浆NO水平明显升高。Reagan et al（1999）研究发现，NMDA受体的阻断剂及其相关药物可以减少慢性应激引起的海马内nNOS的mRNA表达。 新近的研究还表明，iNOS抑制剂可以改善CUMS引起的行为学变化(Wang et al, 2008a)。 nNOS和iNOS产生过量的NO有神经毒作用，有研究发现慢性综合应激可导致大脑边缘系统和海马NOS阳性神经元增加，使NO过多，海马神经元受损(Kone et al, 2003)。Wang et al（2008b）的研究发现，慢性不可预见性应激及海

马BDNF下降所引起的抑郁样行为表现与海马nNOS升高密切相关，NOS增多是引起抑郁发生的重要环节。这些结果提示慢性应激使大鼠海马神经元损伤，导致情绪行为改变，其途径可能很多，但谷氨酸—NMDA受体—Ca^{2+}超载—NO路径可能是海马损伤诱发抑郁的一个重要途径。为了探讨应激引起抑郁发生中，Glu-NMDA受体与NO的关系，本实验通过海马注射NMDA及MK-801，在观察动物行为变化的同时，也对海马nNOS和iNOS的表达进行了观察统计，研究结果显示，CUMS和海马注射NMDA均能提高海马齿状回和CA3 区nNOS、iNOS的表达，提示NO的过量释放可能在慢性应激性抑郁症发病中起重要作用，且NOS的升高与Glu-NMDA受体激活相关。然而，慢性应激的同时给予MK-801 后，海马齿状回nNOS的表达明显降低，而iNOS仍高表达，海马CA3 区iNOS和nNOS表达虽未恢复到正常水平，但与CUMS组相比，都有显著下降。这说明在海马不同区域，Glu-NMDA与不同的NOS激活的路径可能有区别。海马CA3 区与齿状回细胞不同，海马CA3 区神经元全部为谷氨酸能神经元，是对应激极度敏感的一个亚区(Zhang, 2001)。应激使Glu浓度升高，通过NMDA受体引起Ca^{2+}内流，进一步激活nNOS和iNOS，过量的NO释放产生神经毒作用，使CA3 区神经元萎缩。在齿状回，应激条件下，nNOS的表达是导致NO升高的关键，NO增多，一方面产生神经毒作用；另一方面激活iNOS (Mishra et al, 2006)。iNOS在很低浓度时就能与钙调蛋白形成牢固的复合物，一旦iNOS被激活，其活性便可持续相当长时间， 从而大量、持续地生成NO (Zhong & Wu，2006)。这些研究提示，应激一旦激活iNOS使其高表达，便会持续产生NO，很难下降。本实验结果与上述实验中慢性应激的同时给予MK-801 后齿状回iNOS持续高的表达相一致。在微量给予NMDA受体激动剂后，动物行为表现与CUMS组相似，海马齿状回nNOS表达显著升高，CA3 区nNOS也略有升高， 但与对照组无显著差异；而iNOS在海马齿状回和CA3 区均表现出明显高表达。此结果也提示，CA3 区可能对NMDA受体激活导致的神经损伤存在反馈调节机制，而nNOS产生的NO激活了iNOS，并且大量、持续地生成NO，导致神经毒性作用。

综上所述，慢性应激和海马注射 NMDA 均能引起抑郁样行为表现，同时，海马 NOS 表达升高。NMDA 受体的拮抗剂能抑制应激引起的 NOS 的高表达，有效地改善慢性应激引起的抑郁样行为表现。这说明 Glu 过量释放，NMDA 受体过度激活，NOS 高表达，NO 过量产生，导致海马神经元损伤可能是慢性应激性抑郁的发生的主要原因之一。研究提示，通过对 NMDA 受体的调节，降低 NOS 过度表达可能是抑郁症治疗的重要策略之一。抑郁症的发生机制十分复杂，但通过对 NMDA 受体的调节是有效治疗的一个重要靶点。

参考文献:

Bowman RE, Beck KD, Luine VN. 2003. Chronic stress effects on memory: sex differences in performance and monoaminergic activity [J]. *Horm Behav*, **43**: 48-59.

Duman RS, Malberg J, Thome J. 1999. Neural plasticity to stress and antidepressant treatment [J]. *Biol Psychiatry*, **46**(9): 1181-1191.

Finkel MS, Laghrissi TF, Pollock BG, Rong J. 1996. Paroxetine is a novel nitric oxide synthase inhibitor[J]. *Psychopharmacol Bull*, 32(4): 653-658.

Franke L, Schewe H-J, Uebelhack R, Müller-Oerlinghausen B. 2003. High platelet-serotonin uptake activity is associated with a rapid response in depressed patients treated with amitriptyline[J]. *Neurosci Lett*, **345**(2): 105-108.

Kim JJ, Diamond DM. 2002. The stressed hippocampus, synap tic plasticity and lostmemories [J]. *Nat Rev Neurosei*, **3**: 453-462.

Kone BC, Kuncewicz T, Zhang W, Yu ZY. 2003. Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, **285**(2): F178-F190.

Luo L, Tan RX. 2001. Fluoxetine inhibits dentric atrophy of hippocampal neurons by decreasing nitric oxide synthase expression in rat depression model[J]. *Acta Pharmacol Sin*, **22**(10): 865-870.

Li XH, Han C, Zhang LF, Xie JP. 2002. The effect of neurotrophic factor in chronic irritability rats with moxibustion at dazhui point[J]. *Acta Chn Med Pharmacol*, **30**(6): 51-54. [李晓泓, 韩 毳, 张露芳, 解秸萍. 2002. 艾灸大椎穴对慢性应激大鼠神经营养因子的影响. 中医药学报, **30**(6): 51-54.]

Lin YH, Liu AH, Xu Y, Tie L, Yu HM, Li XJ. 2005. Effect of chronic unpredictable mild stress on brain-pancreas: relative protein in rat brain and pancreas[J]. *Behav Brain Res*, **165**(1): 63-71.

Mishra OP, Mishra R, Ashrafand QM, Delivoria-Papadopoulos M. 2006. Nitric Oxide-Mediated Mechanism Of Neuronal Nitric Oxide synthase and Inducible Nitric Oxide synthase Expression During Hypoxia in the Cerebral Cortex of Newborn Piglets[J]. *Neuroscience*, **140**(3): 857-863.

Maeng S, Zarate CA, Jr Du J, Schloesser RJ, McCammon J, Chen G, Manji HK. 2008. Cellular Mechanisms Underlying the Antidepressant Effects of Ketamine: Role of α-Amino-3-Hydroxy-5-Methylisoxazole-4-Propionic Acid Receptors[J]. *Biol Psychiatry*, 63(4): 349-352.

Naranjo CA, Tremblay LK, Busto UE. 2001. The role of the brain reward system in depression[J]. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry*,

25(4): 781-823.

Nacher J, Pham K, Gil-Fernandez V, McEwen BS. 2004. Chronic restraint stress and chronic corticosterone treatment modulate differentially the expression of molecules related to structural plasticity in the adult rat piriform cortex[J]. *Neuroscience*, **126**(2): 503-509.

Papp M, Moryl E. 1994. Antidepressant activity of non-competitive and competitive NMDA receptor antagonists in a chronic mild stress model of depression[J]. *Eur J Pharmacol*, **263**(1-2): 1-7.

Paul IA. 2001. Antidepressant activity and calcium signaling cascades[J]. *Hum Psychopharmacol*, **16**(1): 71-80.

Qin XS. 2002. Nitric oxide and brain impairment in depression[J]. *Foreign Med Sci Sect Psychiatry*, **29**(3): 150-152. [秦晓松. 2002.一氧化氮与抑郁症的脑损害. 国外医学精神病学分册, **29**(3): 150-152.]

Rajkoska G. 2000. Postmortem studies in mood disorders indicate altered numbers of neurons and glial cells [J]. *Biol Psychiatry*, **48**(8): 766-777.

Reagan LP, McKittrick CR, McEwen BS. 1999. Corticosterone and phenytoin reduce neuronal nitric oxide synthase messenger RNA expression in rat hippocampus[J]. *Neuroscience*, **91**(1): 211-219.

Suzuki E, Yagi G, Nakaki T, Kanba S, Asai M. 2001. Elevated plasma nitrate levels in depressive states[J]. *J Affect Disord*, **63**(1-3): 221-224.

Schechter LE, Ring RH, Beyer CE, Hughes ZA, Khawaja X, Malberg JE, Rosenzweig-Lipson S. 2005. Innovative approaches for the development of antidepressant drugs: current and future strategies[J]. *Neuro Rx*, **2**(4): 590-611.

Wang D, An SC, Zhang X. 2008a. Prevention of chronic stress-induced depression-like behavior by inducible nitric oxide inhibitor[J]. *Neurosci Lett*, **433**(1): 59-64.

Wang D, An SC. 2008b. Role of brain-derived neurotrophic factor and neuronal nitric oxide synthase in stress- induced depression[J]. *Neural Regener Res*, **3**(4): 384-389.

Wang MJ, Kuang L. 2005. Association between cerebral hippocampal formation and depressive disorder[J]. *Chn J Clin Rehabil* **9**(48): 116-119. [王敏建, 况　利. 2005. 脑海马结构与抑郁障碍的关系. 中国临床康复, **9**(48): 116-119.]

Wegener G, Volke V, Harvey BH, Rosenberg R. 2003. Local, but not systemic, administration of serotonergic antidepressants decreases hippocampal nitric oxide synthase activity[J]. *Brain Res*, **959**(1): 128-134.

Willner P, Towell A, Sampson D, Sophokleous S, Muscat R. 1987. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant[J]. *Psychophar-macology Berl*, **93**(3): 358-364.

Willner P. 1997. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation[J]. *Psychopharmacology* :*Berl*, **134**(4): 319-329.

Xu J, Li XQ. 2003. The establishment and evaluation of chronic unpredictable mild stress depression model[J]. *Chn J, Behav Med Sci*, **12**(1): 14-17. [许　晶, 李晓秋. 2003. 慢性应激抑郁模型的建立及其评价. 中国行为医学科学, **12**(1): 14-17.]

Xie SF, Ma H, Liu W, Peng M, Ding BK. 2004. Studying apoptosis in the hippocampus of the depression model of rats[J]. *Chn J Nerv Ment Dis*,**30**(5): 342-345. [谢守付, 马　慧, 刘　伟, 彭　淼, 丁宝坤. 2004. 抑郁症模型鼠海马神经元细胞凋亡的初步研究. 中国神经精神疾病杂志, **30**(5): 342-345.]

Yan J, Wang CA, Ye AL, Chen YZ. 1995. The effect of stress on behaviors and glutamate levels of four brain regions[J]. *Acta Psychol Sin*, **27**(4): 422-427. [严　进, 王春安, 叶阿莉, 陈宜张. 1995. 应激对大鼠行为和部分脑区谷氨酸含量的影响. 心理学报, **27**(4): 422-427.]

Zhang YM. 2001. Chronic stress, brain impairment and depression[J]. *Foreign Med Sci Sect Psychiatry*, **28**(2): 105-109. [张艳美. 2001. 慢性应激、大脑损害与抑郁症. 国外医学精神病学分册, **28**(2): 105-109.]

Zhong P, Wu DH. 2006. Effects of intraperitoneal injection of LPS on expression of nNOS and iNOS in rats hippocampus[J]. *Prog Mod Biomed*, **6**(7): 29-30. [钟　萍, 吴丹红. 2006. 腹腔注射 LPS 对大鼠海马 nNOS 和 iNOS 表达的影响. 现代生物医学进展, **6**(7): 29-30.]